

Costruzione di una mappa di linkage ad alta densità per il breeding in castagno

Daniela Torello-Marinoni¹, Sogo Nishio², Nadia Valentini¹, Alberto Acquadro¹, Ezio Portis¹, Aziz Akkak³, Paola Ruffa¹, Vera Pavese¹, Roberto Botta¹

¹DISAFA-Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi Torino

²Pear and Chestnut Breeding Unit, Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO, Tsukuba (Giappone)

³Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di Foggia

Le mappe genetiche rappresentano uno strumento fondamentale per studiare le basi genetiche di caratteri agronomici e merceologici di interesse. Le mappe servono infatti a ricostruire la struttura dei cromosomi allineando marcatori molecolari e caratteri fenotipici in base alla loro posizione sui cromosomi stessi. In tal modo è possibile mettere in relazione i marcatori con i caratteri ed utilizzare queste conoscenze per isolare geni utili o per agevolare nei programmi di miglioramento genetico la selezione precoce di piante recanti caratteri di interesse (*Marker Assisted Selection*, MAS).

In tale contesto, l'obiettivo di questo lavoro è stato lo sviluppo di una mappa genetica di *Castanea spp.*, per studiare il carattere di resistenza nei confronti del cinipide galligeno *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu e identificare regioni cromosomiche associate ad altri caratteri di interesse. Molti importanti caratteri agronomici e fenologici, sono infatti controllati da più geni e per questo vengono detti 'quantitativi'; le regioni genomiche contenenti questi geni sono quindi conosciute come quantitative trait loci (QTL) (Collard *et al.*, 2005).

Al fine dell'ottenimento della mappa genetica, una progenie ottenuta da incrocio controllato tra l'ibrido euro-giapponese 'Bouche de Bétizac' (*C. sativa* 'Bouche Rouge' x *C. crenata* CA04), resistente al cinipide, e la cultivar 'Madonna' (*Castanea sativa*), sensibile al cinipide, è stata messa a dimora nell'autunno 2011 presso il vivaio regionale "Gambarello" di Chiusa Pesio (CN).

Il lavoro si è articolato in tre fasi: 1) caratterizzazione fenotipica mediante osservazione in campo della segregazione del carattere di resistenza al cinipide e di altri caratteri (epoca di germogliamento e habitus della pianta); 2) analisi molecolari mediante marcatori microsatelliti SSR (*Simple Sequence Repeat*) e mediante marcatori SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*); 3) individuazione di QTL mediante elaborazione dei dati molecolari e fenotipici.

Caratterizzazione fenotipica dei caratteri (resistenza al cinipide, epoca germogliamento e habitus pianta)

Le piante della progenie oggetto di studio sono state inizialmente verificate per essere resistenti o sensibili al cinipide, mediante valutazione visiva, dopo infestazione controllata con *D. kuriphilus*. Le piante sono state poste in condizioni di alta pressione da parte dell'insetto (1 insetto ogni 2,5 gemme) in ambiente controllato all'interno di strutture metalliche (moduli). La valutazione per la sensibilità/resistenza al cinipide è stata effettuata su 150 piante della progenie; 79 piante sono risultate essere sensibili e 71 resistenti. Tali valori coincidono con il rapporto teorico 1:1 caratteristico di una resistenza di tipo mendeliano, da cui si deduce che 'Bouche de Bétizac' è portatrice del carattere dominante di resistenza in condizioni di eterozigosi. Il carattere di resistenza presente in 'Bouche de Bétizac' deriva presumibilmente dal parentale di *C. crenata* 'CA04' (resistente) mentre l'altro parentale 'Bouche Rouge' (*C. sativa*) è sensibile all'insetto.

Nella progenie sono stati successivamente rilevati i caratteri epoca di germogliamento e habitus della pianta. Nella primavera 2013, 2014, 2016 e 2017, è stata registrata con cadenza settimanale l'epoca di germogliamento, utilizzando una classificazione dello stato delle gemme in 6 stadi (Fernández López *et al.*, 2002). Come indicazione dell'epoca di germogliamento è stato considerato il passaggio dalla fase 4 alla fase 5 (gemme in cui inizia la fuoriuscita delle foglie e si distinguono le nervature). Le piante sono quindi state suddivise in classi da molto precoce (classe 1) a molto tardiva (classe 9) (UPOV, 2015).

Nell'anno 2016 è stato inoltre rilevato l'habitus delle piante, utilizzando una suddivisione in 5 classi di portamento (1=molto eretto; 2=eretto; 3=semi-eretto; 4=espanso; 5=molto espanso/procombente; UPOV, 2015 modificato).

I dati raccolti hanno mostrato una distribuzione normale dei caratteri epoca di germogliamento e portamento della pianta, con pochi individui posti nelle classi estreme. La distribuzione più regolare del carattere epoca di germogliamento si è avuta nel 2017; negli altri anni si è osservata una distribuzione meno regolare influenzata dall'andamento climatico. La maggior parte delle piante ha mostrato un germogliamento precoce (classe 3) o medio-precoce (classe 4). Per quanto riguarda il portamento, la maggior parte delle piante (43%) ha mostrato un habitus semieretto, similmente a 'Madonna'.

Analisi molecolari mediante marcatori microsatelliti SSR e saturazione della mappa mediante marcatori SNP

L'estrazione del DNA è stata effettuata seguendo il protocollo di Doyle e Doyle (1987). Gli individui F1 della progenie sono stati genotipizzati con 132 marcatori microsatelliti identificati in *C. sativa*, *C. mollissima*, *C. crenata*, *Quercus rubra* e *Q. petraea* (Steinkellner *et al.*, 1997; Kampf *et al.*, 1998; Aldrich *et al.*, 2002; Buck *et al.*, 2003; Marinoni *et al.*, 2003; Kubisiak *et al.*, 2013; Nishio *et al.*, 2011; A. Akkak, pers. commun.). I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su un sequenziatore capillare Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA) e i dati sono stati elaborati mediante il software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

La tecnica *Double-digest restriction site-associated DNA-Seq* (ddRAD-Seq; Shirasawa *et al.*, 2016) che permette di identificare migliaia di marcatori SNP, è stata successivamente applicata all'analisi del genoma dei parentali 'Bouche de Bétizac' e 'Madonna' e dei 150 individui della loro progenie, al fine di saturare la mappa genetica realizzata con gli SSR e delineare, in modo più preciso, i QTL (*Quantitative Trait Loci*) e i marcatori strettamente associati ai caratteri di interesse. Il DNA estratto è stato inviato alla ditta MacroGen Japan Corp. Le sequenze ottenute dall'analisi dei frammenti ottenuti sono state successivamente elaborate con appositi software (BWA, SAMTOOLS) al fine di identificare i marcatori SNP. In tal modo sono stati individuati 27.315 SNP di alta qualità. Tra questi, al fine di ottenere un numero di marcatori efficace per realizzare le due mappe sature e al tempo stesso ottenere una migliore gestione informatica dei dati, sono stati selezionati 10.729 SNPs segreganti nella progenie.

Il software JoinMap® 4 (Van Ooijen, 2006) è stato quindi utilizzato per costruire le mappe di 'Bouche de Bétizac' e 'Madonna' con la strategia dello pseudo-

testcross a due vie (Grattapaglia e Sederoff, 1994). Per ottenere mappe genetiche di alta qualità, un'ulteriore selezione è stata effettuata applicando il metodo del 'LOD score'. Il LOD può essere definito come il log10 del rapporto tra la probabilità che i dati relativi alle segregazioni di due coppie alleliche derivino da loci associati piuttosto che da loci indipendenti. Solo i marcatori strettamente associati tra loro (valore soglia LOD ≥ 8), sono stati pertanto selezionati per costruire le mappe dei due parentali. I *linkage groups* (LG) sono stati denominati in accordo con la mappa di *C. mollissima* (Kubisiak *et al.*, 2013) e le mappe sono state disegnate con il software MapChart ver. 2.2 (Voorrips, 2002).

La mappa del parentale femminile 'Bouche de Bétizac' consiste di 12 LG contenente 1.459 marcatori (119 SSR e 1.340 SNP) che coprono una lunghezza di 809,6 cM e una densità media di un marcatore ogni 0,55 cM. La mappa ottenuta per il parentale maschile 'Madonna' consiste di 12 LG contenenti 1.089 marcatori (85 SSR e 1.004 SNP) e copre 753,3 cM, con una densità media di un marcatore ogni 0,69 cM. La mappe sono state allineate con successo alla mappa genetica di *C. mollissima* (Kubisiak *et al.*, 2013).

Il carattere di resistenza a *Dryocosmus kuriphilus* (*Dk*) è stato mappato sul LG K della mappa di 'Bouche de Bétizac'. I marcatori SNP più vicini si trovano ad una distanza di 0,07 cM mentre i marcatori SSR più vicini sono a 4,4 – 9,0 cM di distanza.

Individuazione QTL (Quantitative Trait Loci) mediante elaborazione dei dati molecolari e fenotipici

I dati molecolari e i dati fenotipici rilevati in campo sono stati utilizzati per l'individuazione di regioni QTL, legate ai caratteri epoca di germogliamento e habitus della pianta, su entrambe le mappe dei parentali realizzate con i marcatori SSR utilizzando il software MapQTL® 6 (Van Ooijen, 2009).

Le mappe di linkage e il posizionamento dei QTL sui diversi LG sono stati elaborati utilizzando il software MapChart (Voorrips, 2002).

La regione QTL è considerata tanto più interessante quanto più elevata è la percentuale di variabilità fenotipica spiegata (PV = 10; 'major' QTL) e quanto più viene individuata nella stessa posizione per più anni consecutivi (QTL stabile), a dimostrazione della forte correlazione tra i marcatori e il carattere e della minore influenza ambientale.

Per l'epoca di germogliamento sono stati identificati 11 'major' QTL, di cui 6 sulla mappa del parentale femminile e 5 sulla mappa del parentale maschile

(Torello Marinoni *et al.*, 2018). Per quanto riguarda la mappa di ‘Bouche de Bétizac’, in tutti i quattro anni è stato identificato su LG L un ‘major’ QTL in corrispondenza dei loci SSR PRD31 e CmSI0045 (PV = 28% - 38%). Altri due ‘major’ QTL sono stati identificati in un solo anno su LG B e LG G (PV = 10,4 %). Sulla mappa di ‘Madonna’ è stato identificato in tutti gli anni di osservazione un ‘major’ QTL molto stabile su LG C (PV = 10% - 14%); un altro ‘major’ QTL è stato individuato sul LG I per un solo anno.

Per quanto riguarda il portamento della pianta, 3 ‘major’ QTL sono stati identificati nella mappa del parentale femminile ‘Bouche de Bétizac’ su LG L (PV=15-25%), mentre solo nel 2016, un ‘major’ QTL (PV=10,9%) è stato individuato sul LGB. Nella mappa del parentale maschile ‘Madonna’ 2 ‘major’ QTL sono stati identificati su LG A (PV=10,4-10,7%).

L’individuazione delle regioni QTL sulle mappe saturate con SNP è al momento in corso.

Conclusioni

Per approfondire le conoscenze sulle basi genetiche dei caratteri di importanza agronomica del castagno è stata analizzata a livello molecolare e fenotipico una progenie derivante dall’incrocio di una varietà resistente a *cinipide* (‘Bouche de Bétizac’) ed una varietà sensibile (‘Madonna’). Si sono ottenute due mappe genetiche sature, una per ogni parentale, con marcatori SSR e SNP.

Sulle mappe costruite con i marcatori SSR, è stata mappata la resistenza a *Dryocosmus kuriphilus* (Dk), mentre 16 regioni QTL significative sono state rilevate per l’epoca di germogliamento e il portamento della pianta. L’analisi delle mappe sature permetterà di definire con maggior precisione le regioni QTL e consentirà l’identificazione dei geni coinvolti nell’espressione o nella regolazione dei caratteri di interesse agronomico e tecnologico per il castagno.

Ricerca finanziata dal programma di cooperazione Italia-Francia Alcotra 2007-2013, progetto “Salvaguardia dell’ecosistema Castagno”, e dalla Regione Piemonte.

Bibliografia

- ALDRICH P.R., MICHLER C.H., SUN W., ROMERO-SEVERSON J. 2002. *Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: Quercus rubra)*. Mol. Ecology Notes 2(4), 472-474 <http://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00282.x>.
- BUCK E.J., HADONOU M., JAMES C.J., BLAKESLEY D., RUSSELL K., 2003. *Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (Castanea sativa Mill.)*. Mol. Ecology Notes 3(2), 239-241 <http://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00410.x>.
- COLLARD B.C.Y., JAHUFER M.Z.Z., BROUWER J.B., PANG E.C.K. 2005. *An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts*. Euphytica 142, 169-196 <http://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1987. *A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochemical Bulletin 19, 11-15.
- FERNÁNDEZ LÓPEZ J., ZÁS R., DÍAZ R., 2002. CIFA Lourizán, Xunta de Galicia. Spain.
- GRATTAPAGLIA D., SEDEROFF R., 1994. *Genetic linkage maps of Eucalyptus grandis and Eucalyptus urophylla using a pseudotestcross: mapping strategy and RAPD markers*. Genet. 137(4), 1121-1137.
- KAMPFER S., LEXER C., GLÖSSL J., STEINKELLNER H. 1998. *Characterization of (GA)_n microsatellite loci from Quercus robur*. Hereditas 129, 183-186 <http://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1998.00183.x>.
- KUBISIAK T.L., NELSON C.D., STATON M.E., ZHEBENTYAYEVA T., SMITH C., OLUKOLU B.A., FANG G.C., HEBARD F.V., ANAGNOSTAKIS S., WHEELER N., SISCO P.H., ABBOTT A.G., SEDEROFF R.R., 2013. *A transcriptome-based genetic map of Chinese chestnut (Castanea mollissima) and identification of regions of segmental homology with peach (Prunus persica)*. Tree Genet. Genomes 9, 557-571 <http://doi.org/10.1007/s11295-012-0579-3>.
- MARINONI D., AKKAK A., BOUNOUS G., EDWARDS K.J., BOTTA R., 2003. *Development and characterization of microsatellite markers in Castanea sativa (Mill.)*. Mol. Breeding 11 (2), 127-136.
- NISHIO S., YAMAMOTO T., TERAKAMI S., SAWAMURA Y., TAKADA N., NISHITANI C., SAITO T., 2011. *Novel genomic and EST-derived SSR markers in Japanese chestnuts*. Sci. Hortic. 130, 838-846.
- SHIRASAWA K., HIRAKAWA H., ISOBE S., 2016. *Analytical workflow of double-digest restriction site-associated DNA sequencing based on empirical and in silico optimization in tomato*. DNA Res. 23:145-153.
- STEINKELLNER H., FLUCH S., TURETSCHKE E., LEXER C., STREIFF R., KREMER A., BURG K., GLÖSSL J., 1997. *Identification and characterization of (GA/CT) n-microsatellite loci from Quercus petraea*. Plant Mol. Biol. 33, 1093-1096.
- TORELLO-MARINONI D., NISHIO S., PORTIS E., VALENTINI N., SARTOR C., DINI F., RUFFA P., OGLIETTI S., MARTINO G., AKKAK A., BOTTA R., 2018. *Development of a genetic linkage map for molecular breeding of chestnut*. Acta Hortic. 1220, 23-28. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1220.4
- UPOV [INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS] 2015. *Chestnut: Castanea crenata Sieold Zucc.; Castanea mollissima Blume; Castanea sativa Mill.: Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability*. 2015-07-13. Doc. No. TG/124/4. UPOV, Geneva. Switzerland.
- VAN OOIJEN J.W. 2006. *JoinMap®4: software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*. Kyazma BV, Wageningen.
- VAN OOIJEN J.W. 2009. *MapQTL® 6, software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species*. Kyazma B V, Wageningen.
- VOORRIPS R.E., 2002. *MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs*. Journal of Heredity 93, 77-78 <http://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>.